

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092694** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.03.12

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.05.09

---

(54) **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И  
МОДИФИКАЦИИ ВЯЗКОСТИ БЕЛКОВ**

---

(31) 62/669,440

(32) 2018.05.10

(33) US

(86) PCT/US2019/031438

(87) WO 2019/217626 2019.11.14

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Сюй Сяобинь, Чжан Амин, Цао Юань  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В данном изобретении предлагаются системы и способы определения областей белков, которые вносят вклад в вязкость составов этих белков. Также предлагаются способы модификации вязкости концентрированных белковых составов.

**A1**

**202092694**

**202092694**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565048RU/045

### СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МОДИФИКАЦИИ ВЯЗКОСТИ БЕЛКОВ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение в целом относится к способам прогнозирования вязкости терапевтических антител с высокой концентрацией.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Моноклональные антитела представляют собой быстро развивающийся класс биологических терапевтических агентов. Моноклональные антитела имеют широкий спектр показаний к применению, включая воспалительные заболевания, рак и инфекционные заболевания. Количество коммерчески доступных моноклональных антител растет быстрыми темпами, и к 2020 году прогнозируется появление на рынке ~ 70 продуктов моноклональных антител (Ecker, D.M, et al., mAbs, 7:9-14 (2015)).

В настоящее время наиболее часто применяемым способом введения терапевтических антител является внутривенная (в/в) инфузия. Однако подкожные инъекции все чаще применяются для пациентов с хроническими заболеваниями, которым требуется частое введение дозы. Готовые к применению предварительно заполненные шприцы или автоматические шприц-ручки позволяют пациентам самостоятельно вводить терапевтические антитела. Составы антител для подкожной инъекции обычно более концентрированы, чем для в/в инфузии, поскольку подкожная инъекция представляет собой одно болюсное введение (обычно 1-1,5 мл) в отличие от медленной инфузии антитела на протяжении определенного периода времени в случае в/в инфузии.

Распространенной проблемой, с которой сталкиваются при изготовлении высококонцентрированных терапевтических моноклональных антител, является высокая вязкость (Tomar, D.S., et al., mAbs, 8:216-228 (2016)). Высокая вязкость может обуславливать увеличение времени инъекции и усиление боли в месте инъекции. Помимо проблем с введением, высоковязкие антитела также создают проблемы во время биопереработки раствора антител. Высокая вязкость может увеличить время обработки, дестабилизировать лекарственный продукт и увеличить производственные затраты. Краткосрочные электростатические и/или гидрофобные межбелковые взаимодействия и электроразрывные эффекты могут влиять на концентрационно зависимые характеристики вязкости антител.

Определение конформации и структурной динамики антитела может быть серьезной аналитической проблемой. Многие доступные структурные методы являются либо очень сложными, требующими высоко специализированных навыков и большого количества образцов (количества > мкМ), либо имеют низкое разрешение, что затрудняет подробный структурный анализ. Поэтому желательно иметь в арсенале доступные методы, с помощью которых можно исследовать структуру белка с невысокими требованиями к образцам, хорошим разрешением и относительно быстрым временем

обработки.

Следовательно, целью данного изобретения является создание способов идентификации областей белка, которые вносят вклад в вязкость составов этого белка.

Другой целью изобретения является создание способов изменения вязкости концентрированных белковых растворов.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении предлагаются системы и способы определения областей белков, которые вносят вклад в вязкость составов этих белков. Также предлагаются способы изменения вязкости концентрированных белковых составов.

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ идентификации областей в белке, которые вносят вклад в вязкость белка, путем микродиализа образцов белка в картридже для микродиализа относительно буфера, содержащего дейтерий, по меньшей мере в течение двух разных периодов времени. Затем микродиализ гасят. После этого погашенные образцы анализируют с применением системы масс-спектрометрии с водородно/дейтериевым обменом для определения областей белка в образце, которые имеют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка. Области белка с пониженным уровнем дейтерия вносят вклад в вязкость белка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образцы белка имеют концентрацию от 10 мг/мл до 200 мг/мл белка.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образцы белка подвергают микродиализу в буфере, имеющем pH от 5,0 до 7,5. Предпочтительным буфером для образцов белка является 10 мМ гистидина при pH 6,0. Типовой дейтерийсодержащий буфер включает дейтерий в 10 мМ гистидина при pH 6,0. Обычно микродиализ проводят при температуре от 2 до 6 °C, предпочтительно при 4 °C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения микродиализ проводят при температуре от 20 до 25 °C. Различные образцы можно подвергнуть диализу в течение разного времени, например, один образец можно подвергнуть диализу в течение 4 часов, а другой образец можно подвергнуть микродиализу в течение 24 часов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образцы подвергают диализу в течение 30 минут, 4 часов, 24 часов или в течение ночи, то есть 26 часов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения этап гашения обычно проводят при температуре от -2 до 2°C в течение от 1 до 5 минут.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает этап расщепления белка на пептиды перед масс-спектрометрическим анализом.

В другом варианте осуществления данного изобретения предлагается способ изменения вязкости белкового лекарственного средства путем выявления областей белкового лекарственного средства, которые вносят вклад в вязкость этого белкового лекарственного средства, в соответствии с описанными способами и модификациями областей белкового лекарственного средства, которые определены как способствующие

вязкости белкового лекарственного средства, с целью модификации вязкости указанного белкового лекарственного средства. Области, идентифицированные как вносящие вклад в вязкость лекарственного средства, могут быть модифицированы путем замены одной или большего количества аминокислот по меньшей мере в одной области для уменьшения или увеличения вязкости по желанию.

Белок или белковое лекарственное средство может представлять собой антитело, гибридный белок, рекомбинантный белок или их комбинацию. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1А представляет собой линейный график, демонстрирующий вязкость (сР) mAb1 как функцию концентрации (мг/мл). Фиг. 1В представляет собой линейный график, демонстрирующий вязкость (сР) mAb2 как функцию концентрации (мг/мл).

Фиг. 2А-2F представляет собой схему типового протокола HDX-MS на основе микродиализа. Получают картриджи для микродиализа (Фиг. 2А), буфер D<sub>2</sub>O добавляют в планшет с глубокими лунками (Фиг. 2В), образцы загружают в картриджи для микродиализа (Фиг. 2С), картриджи для микродиализа загружают в планшет с глубокими лунками (Фиг. 2D), образцы инкубируют в буфере D<sub>2</sub>O в течение различных моментов времени (Фиг. 2Е), и образцы удаляют для MS-анализа (Фиг. 2F).

Фиг. 3А - 3F представляют собой типовые спектрограммы поглощения дейтерия с течением времени в образцах не-CDR mAb1 при концентрациях 15 мг/мл (Фиг. 3А - 3С) и 120 мг/мл (Фиг. 3D - 3F) в моменты времени: 0 часов (Фиг. 3А и 3D), 4 часа (Фиг. 3В и 3Е) или 24 часа (Фиг. 3С и 3F) после инкубации дейтерия. Фиг. 3G - 3L представляют собой типовые спектрограммы поглощения дейтерия с течением времени в образцах не-CDR mAb1 при концентрациях 15 мг/мл (Фиг. 3G - 3I) и 120 мг/мл (Фиг. 3J - 3L) в моменты времени: 0 часов (Фиг. 3G и 3J), 4 часа (Фиг. 3H и 3K) или 24 часа (Фиг. 3I и 3L) после инкубации дейтерия. Фиг. 3M и 3N представляют собой графики поглощения дейтерия, демонстрирующие % поглощения дейтерия в зависимости от времени (часы) при концентрации 15 мг/мл (σ) и 120 мг/мл (') для mAb1 HC36-47 и mAb1 LC48-53.

Фиг. 4А - 4В и 4Е - 4F представляют собой графики «бабочка», демонстрирующие относительное поглощение дейтерия в CDR-областях тяжелой цепи для mAb1 (Фиг. 4А и 4Е) и mAb2 (Фиг. 4В и 4F) после 4 часов или 24 часов инкубации дейтерия. Верхние графики представляют концентрацию образца 120 мг/мл, а нижние графики представляют концентрацию образца 15 мг/мл. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение дейтерия (%). Фиг. 4С - 4D и 4G - 4H представляют собой графики остатков, демонстрирующие относительное поглощение дейтерия в CDR-областях тяжелой цепи для mAb1 (Фиг. 4С и 4G) и mAb2 (Фиг. 4D и 4H) после 4 часов или 24 часов инкубации дейтерия. Верхние графики представляют концентрацию образца 120 мг/мл, а нижние графики представляют концентрацию образца 15 мг/мл. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение

дейтерия (%). Фиг. 4G - 4H представляют собой графики остатков, демонстрирующие поглощение дейтерия в легкой цепи mAb1 (Фиг. 4G) и легкой цепи mAb2 (Фиг. 4H) после 4 часов или 24 часов инкубации. Ось X представляет номер пептида, а ось Y представляет дифференциальное поглощение дейтерия (%).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Определения

Применение терминов в единственном и множественном числе и ссылок, указывающих на единственное и множественное число, в контексте описания заявленного в этом документе изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или это явно не противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе предназначено только для применения в качестве условного обозначения конкретной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

Применение термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 10%; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 5%; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 2%; в других вариантах осуществления данного изобретения значения могут находиться в диапазоне значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 1%. Подразумевается, что вышеописанные диапазоны будут понятны из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом явно не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров или типовых формулировок (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничений на объем изобретения, если иное не заявлено. Никакие формулировки в спецификации не следует истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения данного изобретения.

В данном контексте термин «белок» относится к молекуле, содержащей два или большее количество аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды, а также может включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и ADP-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, при этом белки включают, среди

прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или гибридные белки. Белки получают из различных типов рекомбинантных клеток с помощью хорошо известных способов культивирования клеток и обычно вводят в клетку путем трансфекции нуклеотидных векторов, полученных с помощью генной инженерии (например, такой как последовательность, кодирующая химерный белок, или , кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т. д.), при этом указанные векторы могут находиться как эписома или интегрироваться в геном клетки.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных методов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним неодинаковым эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

«CDR» или определяющая комплементарность область представляет собой область гипервариабельности, вкрапленную в более консервативные области, называемые «каркасными областями» (FR). FR могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем.

В данном контексте термин «вязкость» относится к скорости движения жидкости. Это количественный показатель, выражающий величину внутреннего трения, измеряемую силой на единицу площади, сопротивляющейся потоку, в котором параллельные слои с единицей величины расстояния друг от друга имеют единицу величины скорости движения относительно друг друга. В жидкостях вязкость относится к «толщине» жидкости.

Термин «HDX-MS» относится к масс-спектрометрии с водородно/дейтериевым обменом.

В данном контексте термин «диализ» представляет собой метод разделения, который облегчает удаление небольших нежелательных соединений из макромолекул в растворе путем селективной и пассивной диффузии через полупроницаемую мембрану. Образец и буферный раствор (называемый диализатом, обычно в 200-500 раз превышающий объем образца) помещают на противоположные стороны мембраны. Молекулы образца, которые больше, чем поры мембраны, остаются на стороне образца мембраны, но небольшие молекулы и буферные соли свободно проходят через мембрану, в результате чего снижается концентрация этих молекул в образце. Как только поверхность раздела «жидкость-жидкость» (образец на одной стороне мембраны и диализат - на другой) инициируется, все молекулы будут пытаться диффундировать в любом направлении через мембрану, чтобы достичь равновесия. Диализ (диффузия) прекратится, когда будет достигнуто равновесие. Системы диализа также применяются для замены буфера.

Термин «микродиализ» относится к диализу образцов, имеющих объем менее одного миллилитра.

«D<sub>2</sub>O» представляет собой аббревиатуру для дейтерированной воды. Она также известна как тяжелая вода или оксид дейтерия. D<sub>2</sub>O содержит большое количество изотопа водорода дейтерия вместо обычного изотопа водорода, который составляет большую часть водорода в обычной воде. Дейтерий представляет собой изотоп водорода, который вдвое тяжелее из-за добавленного нейтрона.

## **II. Способы идентификации областей белков, вносящих вклад в вязкость**

В данном изобретении описаны системы и способы определения областей белков, которые вносят вклад в вязкость составов этих белков. Также предлагаются способы изменения вязкости концентрированных белковых составов. Разработка высококонцентрированных терапевтических моноклональных антител имеет первостепенное значение для подкожной доставки терапевтических препаратов моноклональных антител. Однако высокая вязкость является проблемой при изготовлении концентрированных препаратов моноклональных антител. Поэтому существует потребность в вычислительных и экспериментальных инструментах для быстрого и эффективного определения зависимых от концентрации характеристик вязкости потенциальных терапевтических средств на ранних этапах процесса их разработки.

### **A. Масс-спектрометрия с водородно/дейтериевым обменом и микродиализом**

В процессе разработки терапевтическое моноклональное антитело может проявлять необычно высокую вязкость, например, при концентрациях > 100 мг/мл по сравнению с другими подобными моноклональными антителами. Это может быть связано с характерными короткодействующими электростатическими и/или гидрофобными межбелковыми взаимодействиями моноклонального антитела при высоких концентрациях. Масс-спектрометрия с водородно/дейтериевым обменом (HDX-MS) является полезным инструментом для исследования конформации, динамики и взаимодействия белков. Однако традиционный анализ HDX-MS с маркировкой

разбавления имеет ограничение на анализ нехарактерного поведения, которое наблюдается только при высоких концентрациях белка.

С целью исследования межбелковых взаимодействий, определяющих высокую вязкость моноклональных антител при высокой концентрации белка с помощью HDX-МС, был разработан метод пассивной HDX-МС, основанный на микродиализе, для достижения мечения HDX без разбавления буфера  $D_2O$ , что позволяет получить профиль характерных молекулярных взаимодействий при различных концентрациях белка. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ идентификации областей в белках, которые вносят вклад в вязкость, путем микродиализа образцов белка в картридже для микродиализа относительно буфера, содержащего дейтерий, по меньшей мере в течение двух разных периодов времени. Затем микродиализ гасят. После этого погашенные образцы анализируют с применением масс-спектрометрии с водородно/дейтериевым обменом для определения областей белка в образце, которые имеют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка. Области белка с пониженным уровнем дейтерия вносят вклад в вязкость белка.

В одном варианте осуществления данного изобретения белки с характеристиками высокой вязкости можно оптимизировать для уменьшения или устранения высокой вязкости. Способы оптимизации белковых лекарственных средств или антител включают, но не ограничиваются ими, оптимизацию аминокислотной последовательности для снижения вязкости, изменение pH или содержания соли в составе или добавление вспомогательного вещества.

В одном варианте осуществления данного изобретения можно протестировать множество терапевтических составов белков или антител, чтобы определить наиболее многообещающего кандидата для дальнейшего продвижения в производстве. Изготавливают образцы с высокой и низкой концентрацией каждого белка или антитела. В одном варианте осуществления данного изобретения высокая концентрация белка или антитела составляет  $> 50$  мг/мл. Высокая концентрация может составлять 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл или  $> 200$  мг/мл. В одном варианте осуществления данного изобретения низкая концентрация антитела составляет  $< 15$  мг/мл. Низкая концентрация может составлять 15 мг/мл, 10 мг/мл, 9 мг/мл, 8 мг/мл, 7 мг/мл, 6 мг/мл, 5 мг/мл, 4 мг/мл, 3 мг/мл, 2 мг/мл, 1 мг/мл, 0,5 мг/мл или  $< 0,5$  мг/мл.

Более подробно этапы описанных способов представлены ниже.

### **1. Водородно/дейтериевый обмен**

Водородно/дейтериевый обмен представляет собой явление, при котором атомы водорода в лабильных положениях в белках спонтанно меняются местами с атомами водорода в окружающем растворителе, который содержит ионы дейтерия (Houde, D. and Engel, J.R., *Methods Mol Biol*, 988:269-289 (2013)). HDX использует три типа атомов водорода в белках: атомы водорода в связях «углерод-водород», группы в боковых цепях и атомы в амидных функциональных группах (также называемые атомами водорода

основной цепи). Скорости обмена атомов водорода в связях «углерод-водород» являются слишком медленными, чтобы их можно было наблюдать, а скорости обмена атомов водорода в боковой цепи (например, OH, COOH) являются настолько высокими, что атомы быстро обмениваются обратно, когда реакция гасится в растворе на основе H<sub>2</sub>O, и обмен не регистрируется. Для получения характеристики структуры и динамики белков пригодны только каркасные водороды, поскольку их скорости обмена поддаются измерению и отражают водородные связи и доступность растворителя. Амидные атомы водорода играют ключевую роль в образовании вторичных и третичных структурных элементов. Измерения скорости их обмена можно интерпретировать с точки зрения конформационной динамики отдельных структурных элементов более высокого порядка, а также общей динамики и стабильности белка.

Скорости обмена отражают конформационную подвижность, силу водородных связей и доступность растворителя в структуре белка. Информация о конформации белка и, что наиболее важно, различиях в конформации белка между двумя или большим количеством форм одного и того же белка может быть получена путем отслеживания реакции обмена. Скорость обмена зависит от температуры и уменьшается примерно в десять раз при понижении температуры с 25 °С до 0 °С. Следовательно, при pH 2-3 и при 0 °С (обычно называемых «условиями гашения») период полужизни для амидного изотопного обмена водорода в неструктурированном полипептиде составляет 30-90 мин, в зависимости от эффекта экранирования растворителя, вызванного боковыми цепями. Водород имеет массу 1,008 Да, а дейтерий (второй изотоп водорода) имеет массу 2,014 Да, при этом за водородным обменом можно следить, измеряя массу белка с помощью масс-спектрометра.

В одном варианте осуществления скорость водородно/дейтериевого обмена используется для определения характеристик вязкости терапевтических средств на основе белков или антител.

## **2. Микродиализ**

Классическое непрерывное HDX-мечение посредством разбавления неприменимо при анализе высококонцентрированных белковых растворов. В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается альтернативный способ HDX-мечения для применения с высококонцентрированными белковыми растворами. HDX-мечение на планшете для микродиализа облегчает анализ высококонцентрированных белковых растворов. Кроме того, применение планшета для микродиализа снижает расход образцов и D<sub>2</sub>O по сравнению с традиционными устройствами для диализа (Houde, D., et al., *J Am Soc Mass Spectrom*, 27 (4): 669-76 (2016)). Планшет для микродиализа может быть коммерчески доступным планшетом для микродиализа, например 96-луночным планшетом для микродиализа Pierce™.

В одном варианте осуществления данного изобретения для анализа высококонцентрированных белковых растворов применяется HDX-обмен с микродиализом. Образцы загружают в картридж для микродиализа планшета для

микродиализа. Буфер D<sub>2</sub>O добавляют в планшет с глубокими лунками или другой подходящий сосуд. Картриджи для микродиализа, содержащие образцы белка, добавляют в буфер и инкубируют по меньшей мере на протяжении 4 часов. Образцы можно инкубировать в течение 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более 24 часов. Указанная система диализа позволяет осуществлять пассивную диффузию буфера в картридж, содержащий образец, чтобы не разбавлять образец, как это обычно бывает при традиционном непрерывном HDX-мечение, когда требуются большие количества буфера. Во время этапа инкубации дейтерий в буфере D<sub>2</sub>O поступает в картридж, содержащий образец, и обменивается с атомами водорода в каркасных амидах образцов белка. После этапа инкубации образцы отбирают из картриджа для микродиализа.

### **3. Приготовления образцов**

После удаления диализованных образцов из картриджа для микродиализа реакцию HDX можно прекратить путем гашения образцов. В одном варианте осуществления данного изобретения гашение достигается путем добавления к образцам гасящего буфера. Гасящий буфер может содержать 6 М GlnHCl и 0,6 М TCEP в H<sub>2</sub>O, pH 2,5. В одном варианте осуществления данного изобретения гасящий буфер содержит 8 М мочевины, 0,6 М TCEP в H<sub>2</sub>O, pH 2,5. В другом варианте осуществления данного изобретения pH конечного погашенного раствора составляет 2,5.

В одном варианте осуществления данного изобретения снижение температуры реакции также может погасить реакцию HDX. Реакцию можно проводить при 0 °C. Скорость обмена уменьшается в десять раз при снижении температуры с 25°C до 0 °C. В одном варианте осуществления данного изобретения реакцию гашения проводят при 0°C или ниже.

После гашения образцы можно разбавить для последующего масс-спектрометрического анализа. Образцы могут быть разбавлены 0,1% муравьиной кислотой (FA) в H<sub>2</sub>O или любым другим пригодным разбавителем для применения в масс-спектрометрии. Затем образцы обрабатывают на масс-спектрометре.

### **4. Масс-спектрометрия**

В одном варианте осуществления данного изобретения масс-спектрометрия применяется для определения сдвигов массы, вызванных обменом водорода на дейтерий (или наоборот) с течением времени. Водород имеет массу 1,008 Да, а дейтерий имеет массу 2,014 Да, поэтому за водородным обменом можно следить, измеряя массу белка с помощью масс-спектрометра. Белки или антитела, которые включают дейтерий, будут иметь повышенную массу по сравнению с нативным белком или антителом, которые не были инкубированы в D<sub>2</sub>O. Как правило, уровень обмененного водорода отражает гибкость, доступность растворителя и взаимодействия водородных связей в белковых структурах.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения для расщепления более крупных белков или антител на более мелкие фрагменты или пептиды применяют

расщепление в режиме онлайн. Обычно применяемые ферменты для расщепления в режиме онлайн включают, но не ограничиваются ими, пепсин, трипсин, трипсин/Lys-C, rLys-C, Lys-C и Asp-N.

В одном варианте осуществления данного изобретения расщепленные белки или антитела подвергают масс-спектрометрическому анализу. Способы проведения масс-спектрометрии известны в данной области техники. См., например, (Aeberssold, M. и Mann, M., *Nature*, 422: 198-207 (2003)). Обычно применяемые типы масс-спектрометрии включают, но не ограничиваются ими, тандемную масс-спектрометрию (МС/МС), масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением, жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС) и матричную лазерную десорбцию/ионизацию (MALDI).

### **III. Способы модификации вязкости белка**

В одном варианте осуществления данного изобретения предлагается способ изменения вязкости белкового лекарственного средства путем выявления областей белкового лекарственного средства, которые вносят вклад в вязкость этого белкового лекарственного средства, в соответствии с описанными способами и модификациями областей белкового лекарственного средства, которые определены как способствующие вязкости белкового лекарственного средства, с целью модификации вязкости указанного белкового лекарственного средства. Области, идентифицированные как вносящие вклад в вязкость лекарственного средства, могут быть модифицированы путем замены одной или большего количества аминокислот по меньшей мере в одной области для уменьшения или увеличения вязкости по желанию.

Например, легкая цепь, тяжелая цепь или определяющие комплементарность области антитела могут быть модифицированы для снижения вязкости концентрированных составов антитела. Типовой концентрированный состав имеет концентрацию антитела больше чем 50 мг/мл, предпочтительно 100 мг/мл или больше.

Другие модификации лекарственного средства на основе белка или антитела включают химические модификации аминокислот в области белка или антитела, которые, как определено, вносят вклад в вязкость лекарственного средства на основе белка или антитела.

В одном варианте осуществления данного изобретения белок, антитело или лекарственный продукт представляет собой или содержит один или большее количество представляющих интерес белков, пригодных для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, представляющий интерес белок включает, но не ограничивается этим, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут быть простыми полипептидами, состоящими из одной субъединицы, или сложными мультисубъединичными белками, содержащими две или большее количество субъединиц. Представляющий интерес белок может быть

биофармацевтическим продуктом, пищевой добавкой или консервантом или любым белковым продуктом, подлежащим очистке и отвечающим стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, двухспецифическую, четырехвалентную G-подобную молекулу иммуноглобулина, называемую иммуноглобулином с двумя переменными доменами (DVD-Ig), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления данного изобретения указанное антитело содержит химерный шарнир. В других вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело содержит химерный Fc. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное антитело выбирают из группы, состоящей из антитела против белка 1 запрограммированной гибели клетки (например, антитела анти-PD1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда 1 запрограммированной гибели клетки (например, антитела анти-PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела против DLL4, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитела анти-ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела анти-AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (например, антитела анти-PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитело против рецептора пролактина (например, антитело анти-PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против комплемента 5 (например, антитела анти-C5, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела анти-TNF, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитело анти-EGFR, как описано в патенте США № 9132192, или антитела анти-EGFRvIII, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (например, антитела анти-PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или в патенте США № 9540449), антитела против фактора 8 роста и дифференцировки (например, антитела анти-GDF8, также

известное как антитело против миостатина, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела анти-GCGR, как описано в публикации заявки на патент США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела анти-VEGF, антитела анти-IL1R, антитело против рецептора интерлейкина 4 (например, антитела анти-IL4R, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или в патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина 6 (например, антитела анти-IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела анти-IL1, антитела анти-IL2, антитела анти-IL3, антитела анти-IL4, антитела анти-IL5, антитела анти-IL6, антитела анти-IL7, антитела против интерлейкина 33 (например, антитела анти-IL33, как описано в патентах США №№ 9453072 или 9637535), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитела анти-RSV, как описано в публикации заявки на патент США № 9447173), антитела против кластера дифференцировки 3 (например, антитела анти-CD3, как описано в патентах США №№ 9447173 и 9447173 и в заявке на патент США № 62/222605) антитела против кластера дифференцировки 20 (например, антитела анти-CD20, как описано в патентах США №№ 9657102 и US20150266966A1, а также в патенте США № 7879984), антитела анти-CD19, антитела анти-CD28, антитела против кластера дифференцировки-48 (например, антитела анти-CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела анти-Fcγd1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела анти-MERS, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена 3 активации лимфоцитов (например, антитела анти-LAG3 или антитела анти-CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитела анти-NGF), как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и в патентах США №№ 8309088 и 9353176, а также антитела против белка Y. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из биспецифического антитела анти-CD3 x анти-CD20 (как описано в публикации заявки на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 x и против муцина 16 (например, биспецифического антитела анти-CD3 x анти-Muc16) и биспецифического антитела против CD3 x и против специфического мембранного антигена простаты (например, биспецифического антитела анти-CD3 x и анти-PSMA). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок выбирают из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адотрастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба,

элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фасинумаба, голимумаба, гузелькумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, связанных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фрагмент Fc включает шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рецепторный Fc-слитый белок содержит две или большее количество отдельных цепей рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с множеством лигандов. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, белок-ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки), или белок-ловушка VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который включает домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитого с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах данного изобретения Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или большее количество из одного или большего количества антигенсвязывающих доменов, таких как фрагмент вариабельной тяжелой цепи и фрагмент вариабельной легкой цепи антитела, связанного с фрагментом Fc.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанное белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. HDX масс-спектрометрия микродиализа**

#### Материалы и способы

mAb1 и mAb2 разводили в 10 мМ гистидина (pH 6,0) для получения образцов с высокой концентрацией (120 мг/мл) и образцов с низкой концентрацией (15 мг/мл). 160 мкл каждого образца загружали в картридж для микродиализа. Картридж вставляли в планшет с глубокими лунками, содержащий буфер D<sub>2</sub>O, и инкубировали в течение 4 или 24 часов при 4 °C. После инкубации 5 мкл каждого диализованного образца гасили

добавлением гасящего буфера к образцу в соответствии с таблицей 1. Гасящий буфер содержал 6 М GlnHCl/0,6 М TCEP в 100% D<sub>2</sub>O. Реакцию гашения проводили при 0°C в течение 3 минут. 10 мкл каждого погашенного образца разбавляли 0,1% FA в D<sub>2</sub>O в соответствии с Таблицей 1. 70 мкл каждого образца загружали в систему HDX.

Таблица 1. Объемы буферов для образцов и буферов для разведения.

Образец	Объем гасящего буфера	Объем буфера для разведения	Количество введения
120 мг/мл	5 мкл → 295 мкл (2 мг/мл)	10 мкл → 130 мкл (0,1 мг/мл)	70 мкл (7 мкг)
15 мг/мл	5 мкл → 70 мкл (1 мг/мл)	20 мкл → 120 мкл (0,1 мг/мл)	70 мкл (7 мкг)

### Результаты

Моноклональное антитело 1 (mAb1) проявляло необычно высокую вязкость при концентрациях > 100 мг/мл по сравнению с другими моноклональными антителами на этапе разработки (Фиг. 1А - 1В). С целью исследования межбелковых взаимодействий, определяющих высокую вязкость mAb1 при высокой концентрации белка, был разработан метод пассивной HDX-МС на основе микродиализа, для достижения мечения HDX без разбавления буфера D<sub>2</sub>O, что позволяет получить профиль характерных молекулярных взаимодействий при различных концентрациях белка (Фиг. 2А - 2F).

Значительное снижение уровня дейтерия наблюдалось в образцах с высокой концентрацией (120 мг/мл) по сравнению с контрольными образцами (15 мг/мл) в трех определяющих комплементарность областях тяжелой цепи, и CDR2 легкой цепи для mAb1 (Фиг. 3А - 3N, Таблица 2 и Таблица 3) Полученный результат указывает на то, что эти CDR могут участвовать в специфических межмолекулярных взаимодействиях, которые могут обуславливать необычно высокую вязкость, наблюдаемую с mAb1. Чтобы подтвердить, что эти CDR являются причиной высокой вязкости, описанный способ был применен для исследования межбелковых взаимодействий при высокой концентрации mAb2, которое имеет ту же аминокислотную последовательность, что и mAb1, за исключением CDR, и характеризуется низкой вязкостью (Фиг. 4В, 4D, 4F и 4H). В отличие от mAb1, между образцами mAb2 с высокой концентрацией и образцами mAb2 с низкой концентрацией не наблюдалось дифференциального поглощения дейтерия, что дополнительно подтверждает, что CDR антитела mAb1 обуславливают высокую вязкость при высоких концентрациях.

Таблица 2. Относительное поглощение дейтерия в пептиде не-CDR mAb1 с течением времени.

Момент времени	mAb1 не-CDR Относительное поглощение дейтерия (%)
----------------	---

	<b>15 мг/мл</b>	<b>120 мг/мл</b>
<b>0 час</b>	0,0%	0,0%
<b>4 часа</b>	36,7%	33,2%
<b>24 часа</b>	41,7%	38,6%

Таблица 3. Относительное поглощение дейтерия в пептиде LC-CDR mAb1 с течением времени.

<b>Момент времени</b>	<b>mAb1 LC-CDR Относительное поглощение дейтерия (%)</b>	
	<b>15 мг/мл</b>	<b>120 мг/мл</b>
<b>0 час</b>	0,0%	0,0%
<b>4 часа</b>	49,8%	39,1%
<b>24 часа</b>	65,6%	52,2%

Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов осуществления, и многие детали были представлены с целью иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что в изобретении допускаются дополнительные варианты его осуществления и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отклонения от основных принципов изобретения.

Все источники информации, цитируемые в данном документе, полностью включены в него посредством ссылок. Данное изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не выходя за рамки его сущности или существенных признаков, и, соответственно, следует делать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предыдущее описание, как указывающую объем изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации областей в белке, которые вносят вклад в вязкость белка, включающий:

микродиализ образцов белка в картридже для микродиализа по отношению к буферу, содержащему дейтерий, по меньшей мере в течение двух различных периодов времени;

последующее гашение микродиализа образцов;

анализ погашенных образцов в системе масс-спектрометрии с водородно/дейтериевым обменом для определения областей белка в образце, которые имеют пониженные уровни дейтерия по сравнению с другими областями белка, при этом области белка с пониженными уровнями дейтерия вносят вклад в вязкость белка.

2. Способ по п. 1, где образцы белка содержат от 10 мг/мл до 200 мг/мл белка.

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в буфере, имеющем pH от 5,0 до 7,5.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где образцы белка на этапе микродиализа находятся в 10 мМ гистидина при pH 6,0.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где буфер, содержащий дейтерий, включает 10 мМ гистидина при pH 6,0.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где микродиализ проводят при температуре от 2 до 6 °C.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере один образец подвергают микродиализу в течение 4 часов и по меньшей мере другой образец подвергают микродиализу в течение 24 часов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где стадию гашения проводят при температуре от -2 до 2°C в течение от 1 до 5 минут.

9. Способ по любому из пп. 1-8, дополнительно включающий расщепление белка до пептидов перед масс-спектрометрическим анализом.

10. Способ модификации вязкости белкового лекарственного средства, включающий:

идентификацию областей указанного белкового лекарственного средства, которые вносят вклад в вязкость белкового лекарственного средства, в соответствии со способом по любому из пп. 1-9,

модификацию одной или большего количества областей, идентифицированных как вносящие вклад в вязкость указанного белкового лекарственного средства, для модификации вязкости белкового лекарственного средства.

11. Способ по п. 10, где по меньшей мере одну из областей, идентифицированную как вносящую вклад в вязкость лекарственного средства, модифицируют путем замены одной или большего количества аминокислот в по меньшей мере одной области.

12. Способ по любому из пп. 10 или 11, где одну или большее количество областей, идентифицированных как вносящие вклад в вязкость белкового лекарственного средства,

модифицируют для снижения вязкости указанного белкового лекарственного средства.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где указанный белок выбирают из группы, состоящей из антитела, слитого белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

14. Способ по любому из пп. 10-13, где указанное белковое лекарственное средство представляет собой концентрированное моноклональное антитело.

15. Белковое лекарственное средство, изготовленное с помощью способа по любому из пп. 10-14.

По доверенности

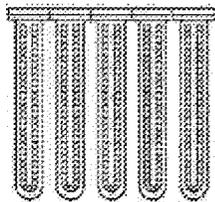
1/13



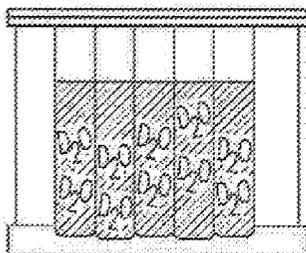
Фиг. 1А



Фиг. 1В



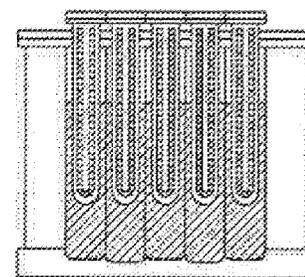
Карtridge для микродиализа  
Фиг. 2А



Добавьте буфер D<sub>2</sub>O в  
планшет с глубокими лунками  
Фиг. 2В



Загрузите образцы  
Фиг. 2С



Поместите cartridge для микродиализа  
в планшет с глубокими лунками  
Фиг. 2D



Время 4 часа  
Время 24 часа

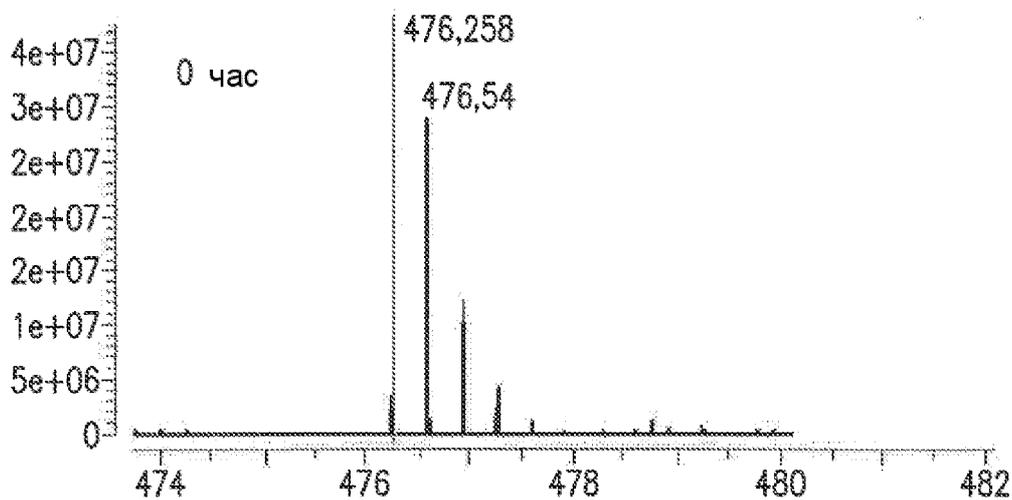
Инкубируйте на разные контрольные  
моменты времени  
Фиг. 2E



Извлеките образцы для MS-анализа  
Фиг. 2F

не-CDR mAb1 15 мг/мл

HeD – Выс. достов. – Балл: 0,9716 – Центроид: 476,54

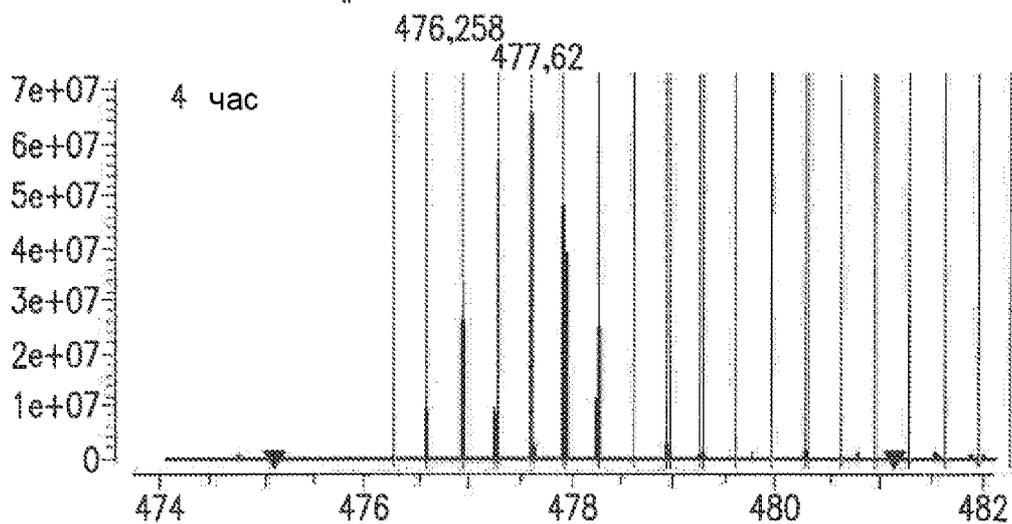


Фиг. 3А

не-CDR mAb1 15 мг/мл

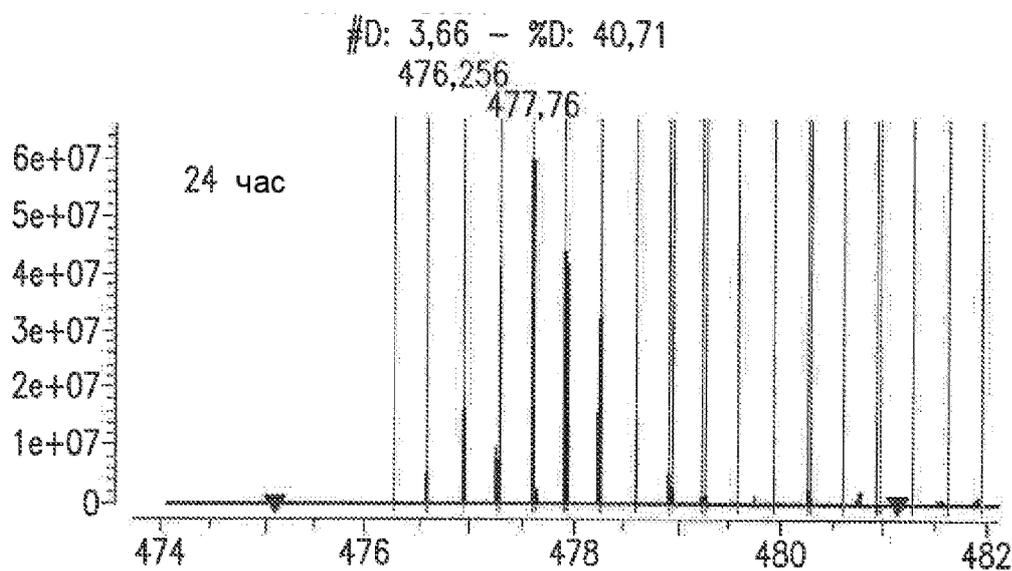
4 час – Выс. достов. – Балл: 0,8900 – Центроид: 477,62

#D: 3,22 – %D: 35,82



Фиг. 3В

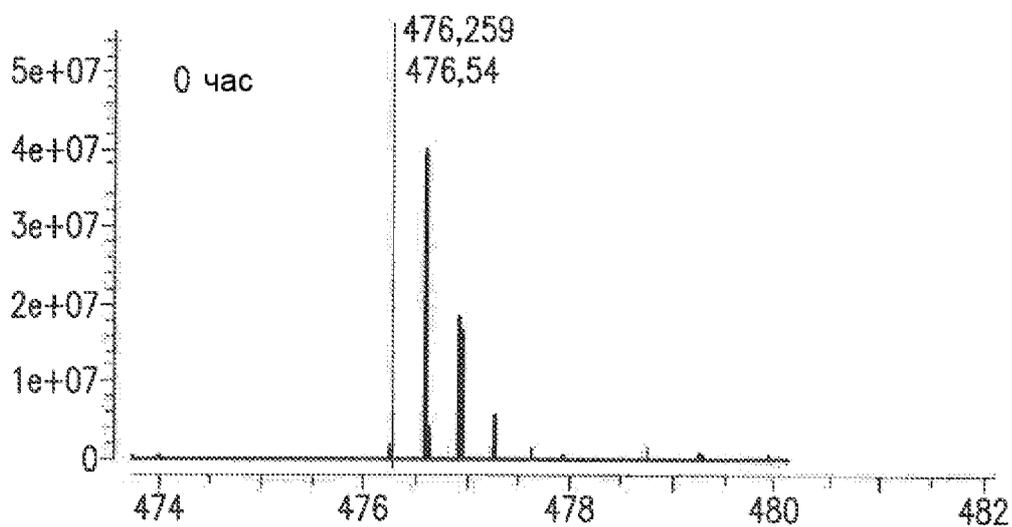
не-CDR mAb1 15 мг/мл



Фиг. 3С

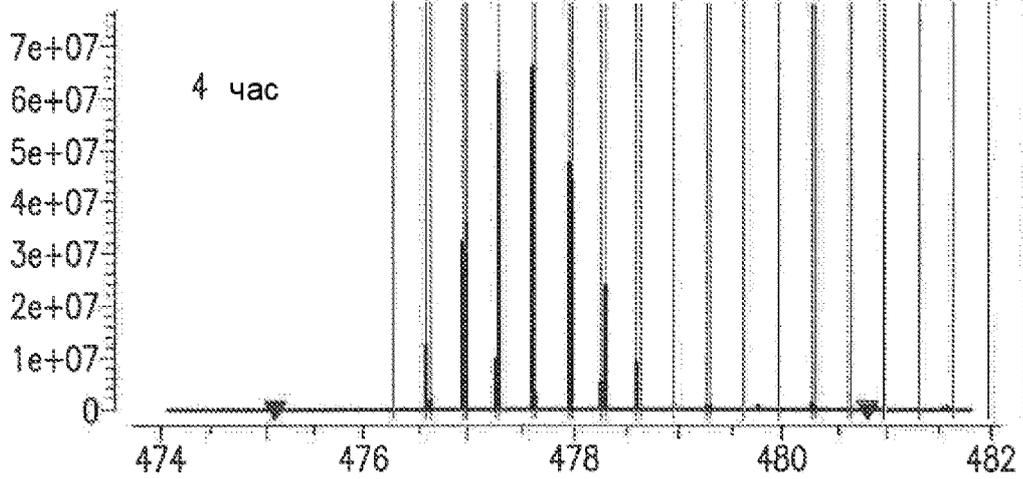
не-CDR mAb1 120 мг/мл

Не-D – Выс. достов. – Балл: 0,9588 – Центроид: 476,54



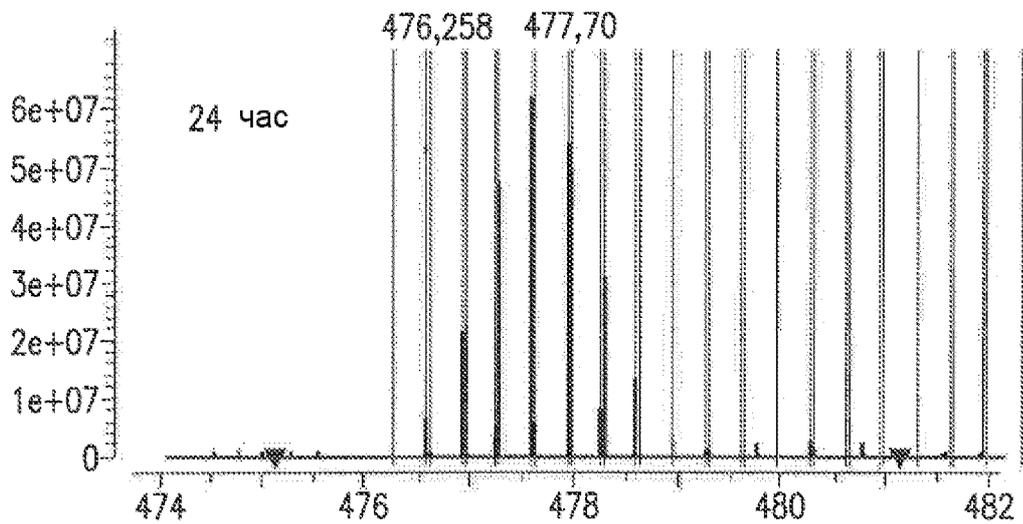
Фиг. 3D

не-CDR mAb1 120 мг/мл  
4 час – Выс. достов. – Балл: 0,8894 – Центроид: 477,57  
#D: 3,08 – %D: 34,20  
476,256  
477,57

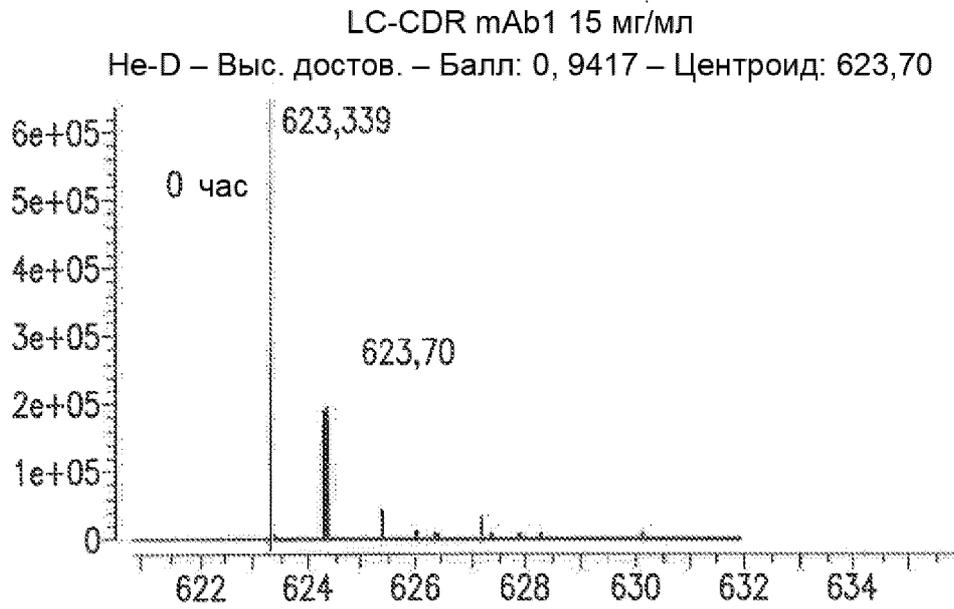


Фиг. 3Е

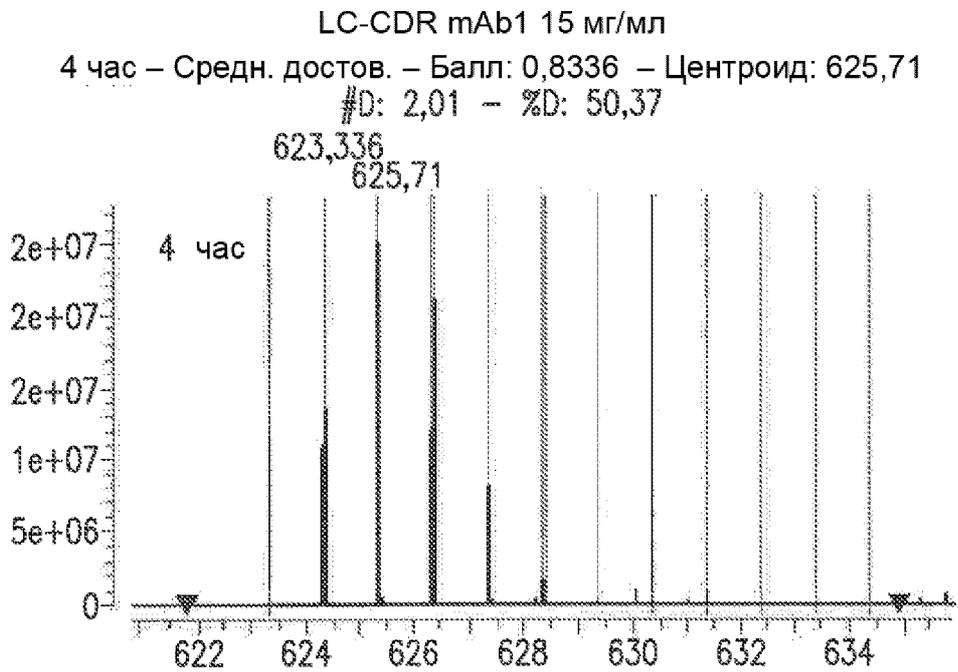
не-CDR mAb1 120 мг/мл  
24 час – Выс. достов. – Балл: 0,8902 – Центроид: 477,70  
#D: 3,48 – %D: 38,67  
476,258 477,70



Фиг. 3F

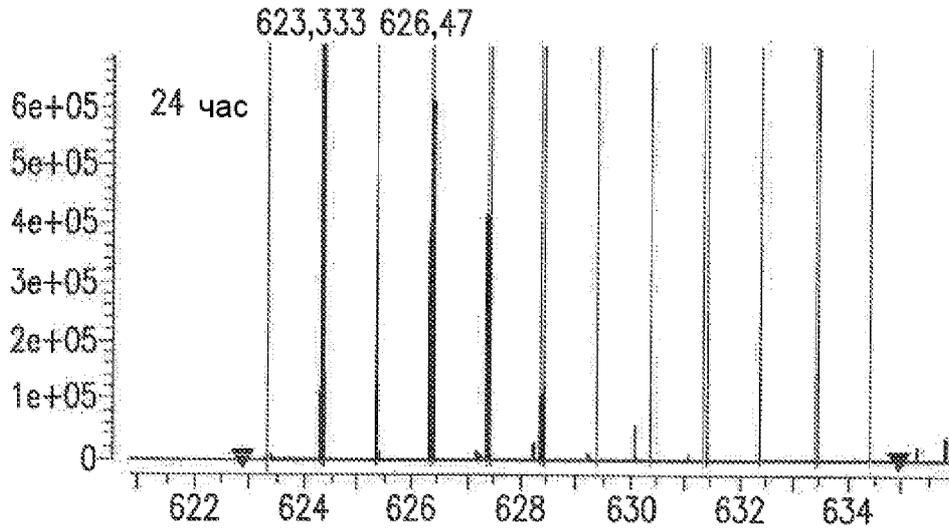


Фиг. 3Г



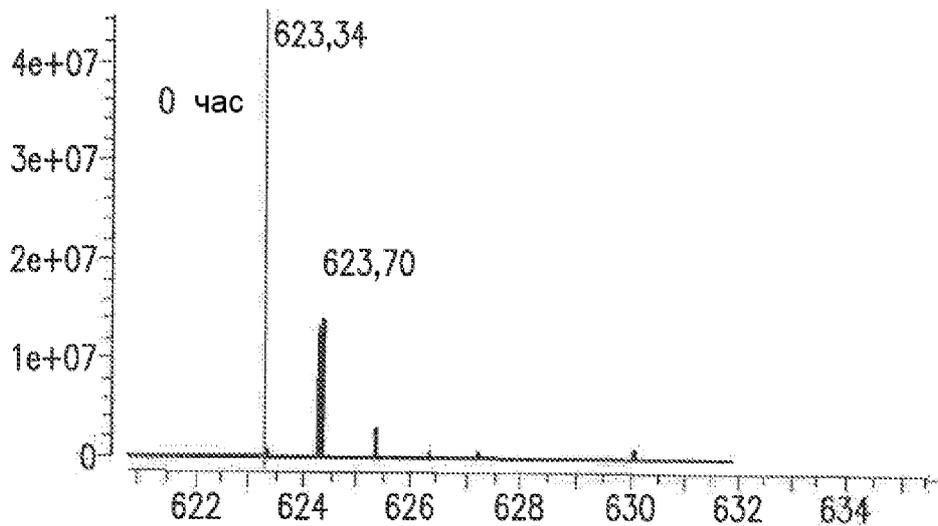
Фиг. 3Н

LC-CDR mAb1 15 мг/мл  
24 час – Средн. достов. – Балл: 0,8243 – Центроид: 624,47  
#D: 2,78 – %D: 69,45

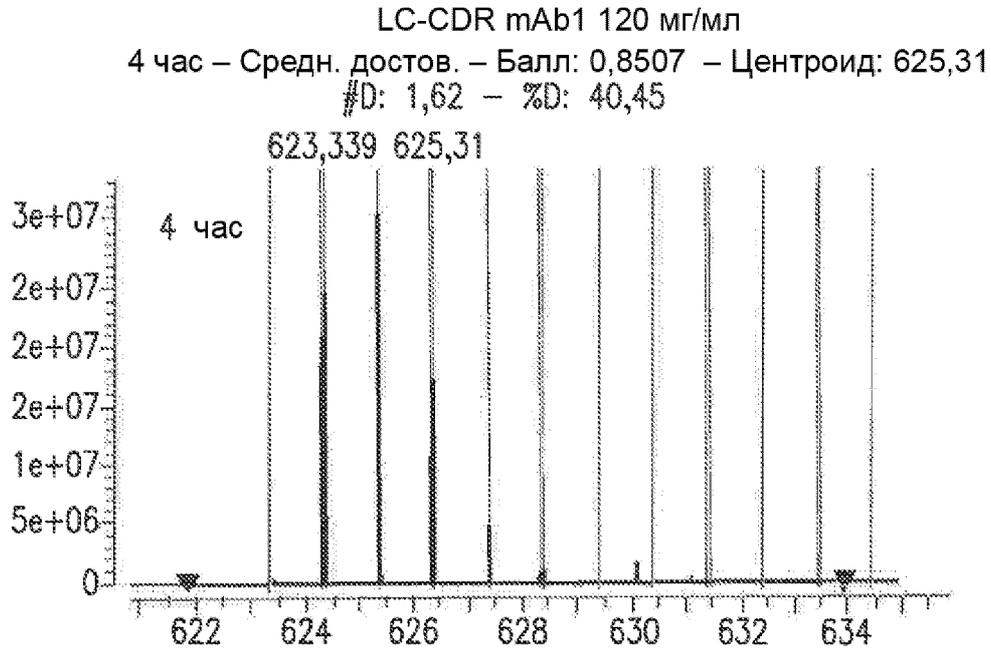


Фиг. 3I

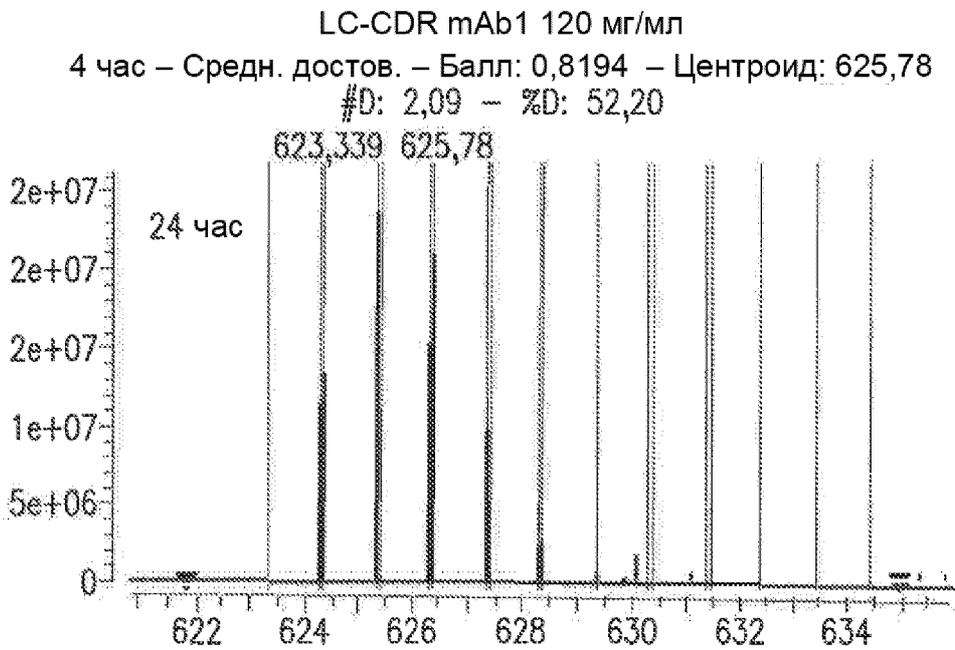
LC-CDR mAb1 120 мг/мл  
He-D – Выс. достов. – Балл: 0,9646 – Центроид: 623,70



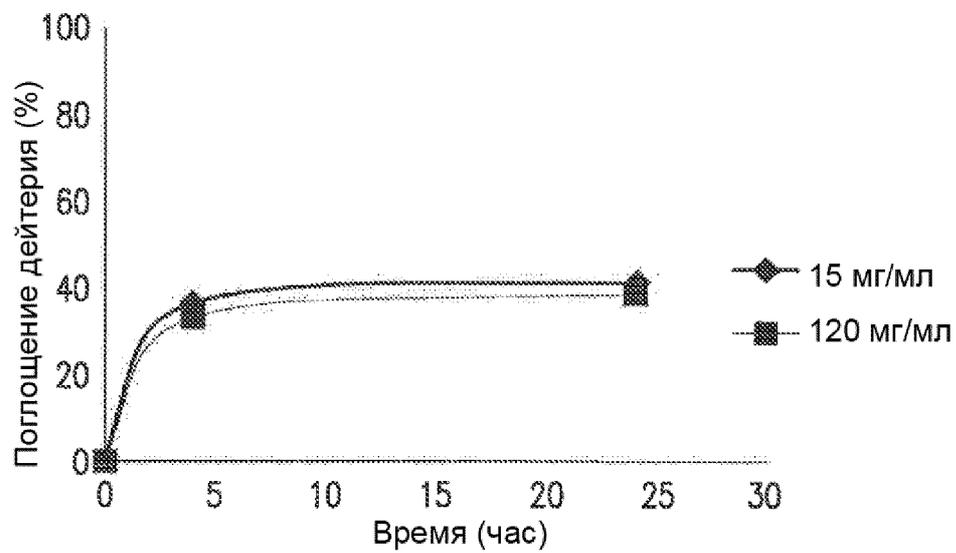
Фиг. 3J



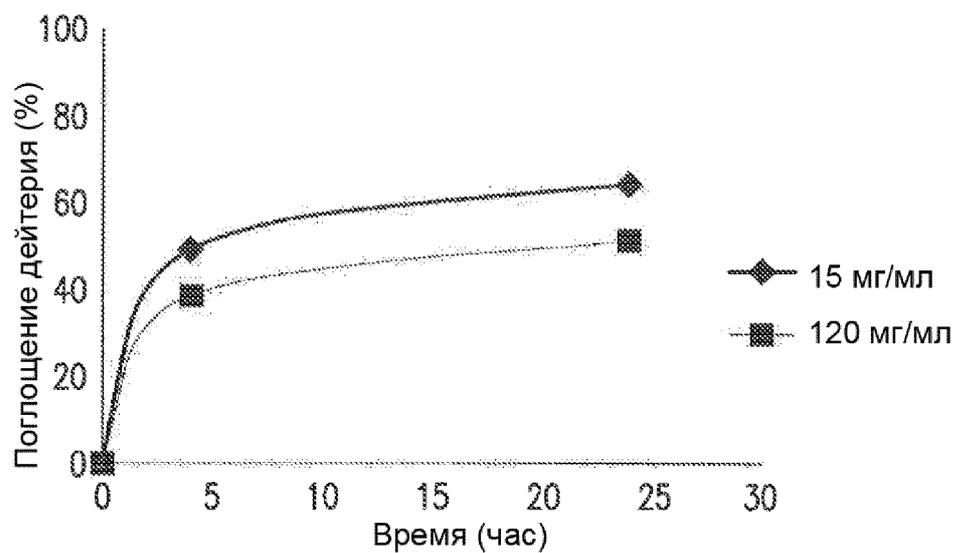
Фиг. 3К



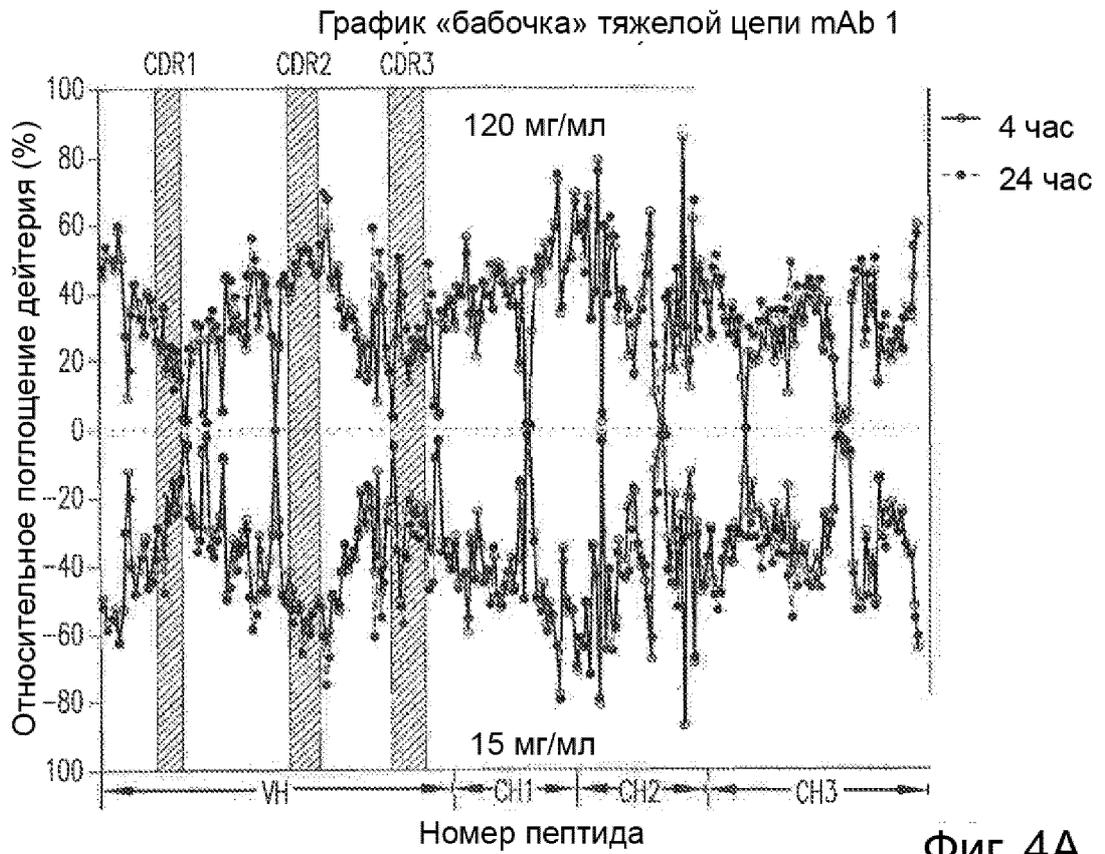
Фиг. 3Л



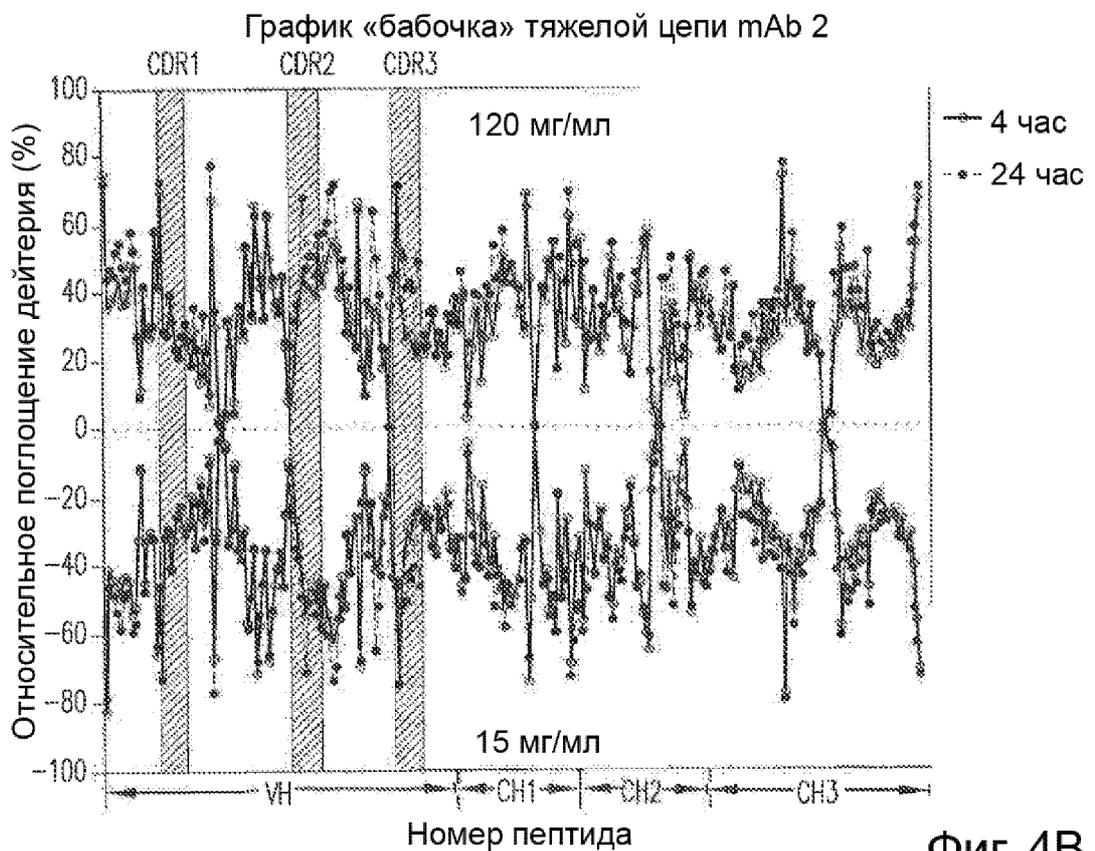
Фиг. 3М



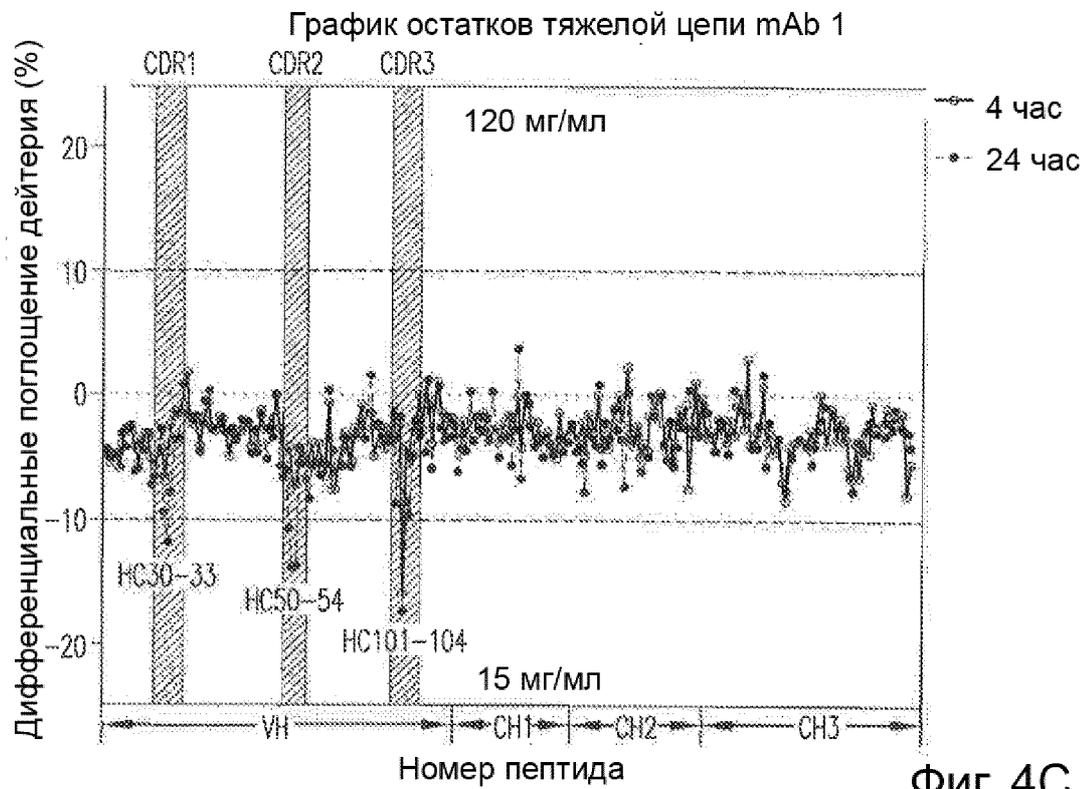
Фиг. 3N



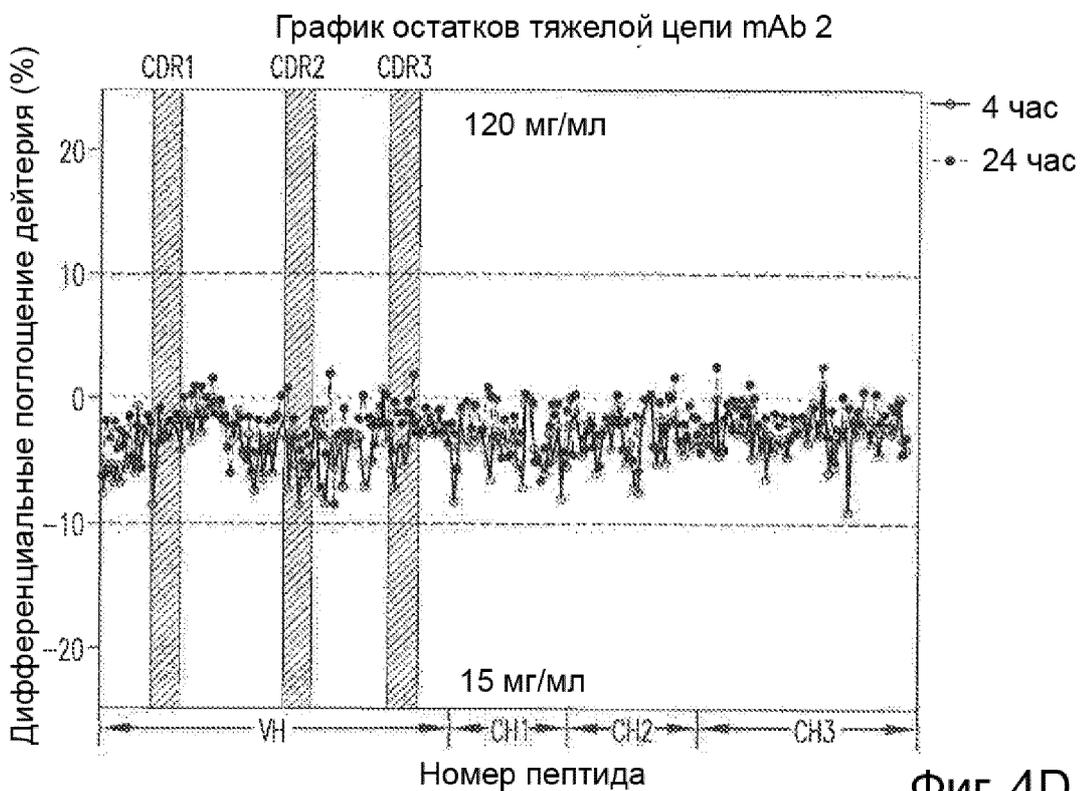
Фиг. 4А



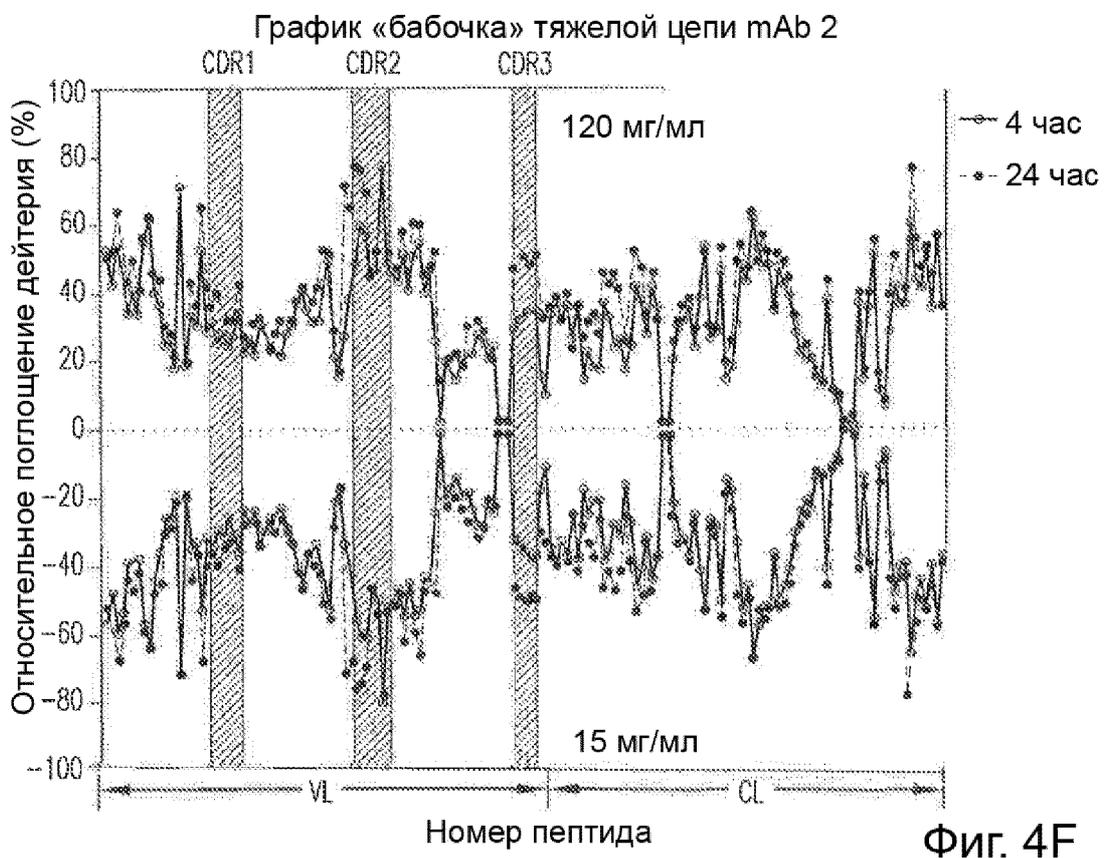
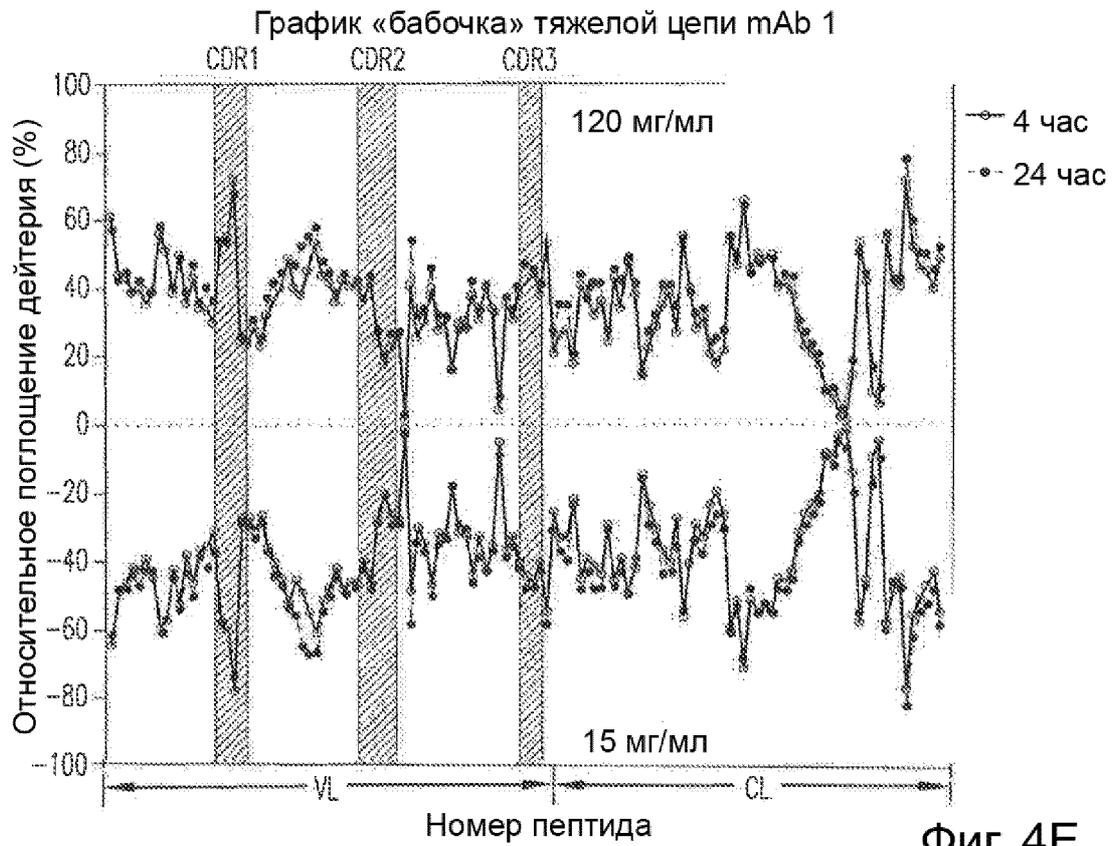
Фиг. 4В

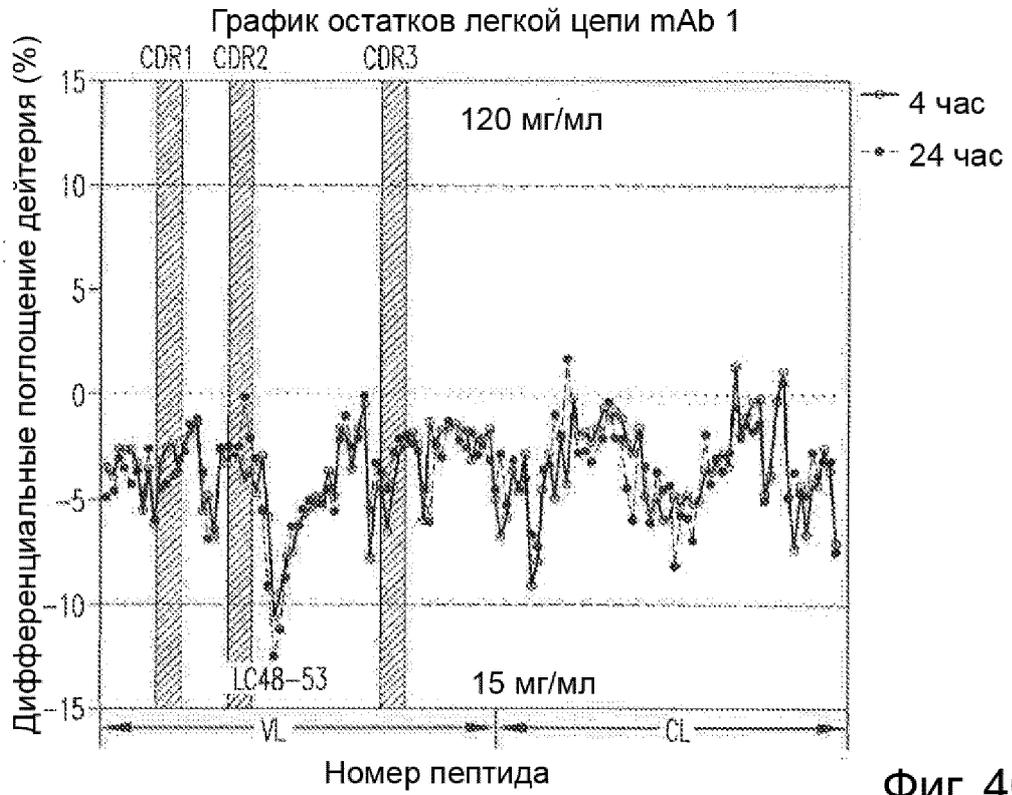


Фиг. 4С

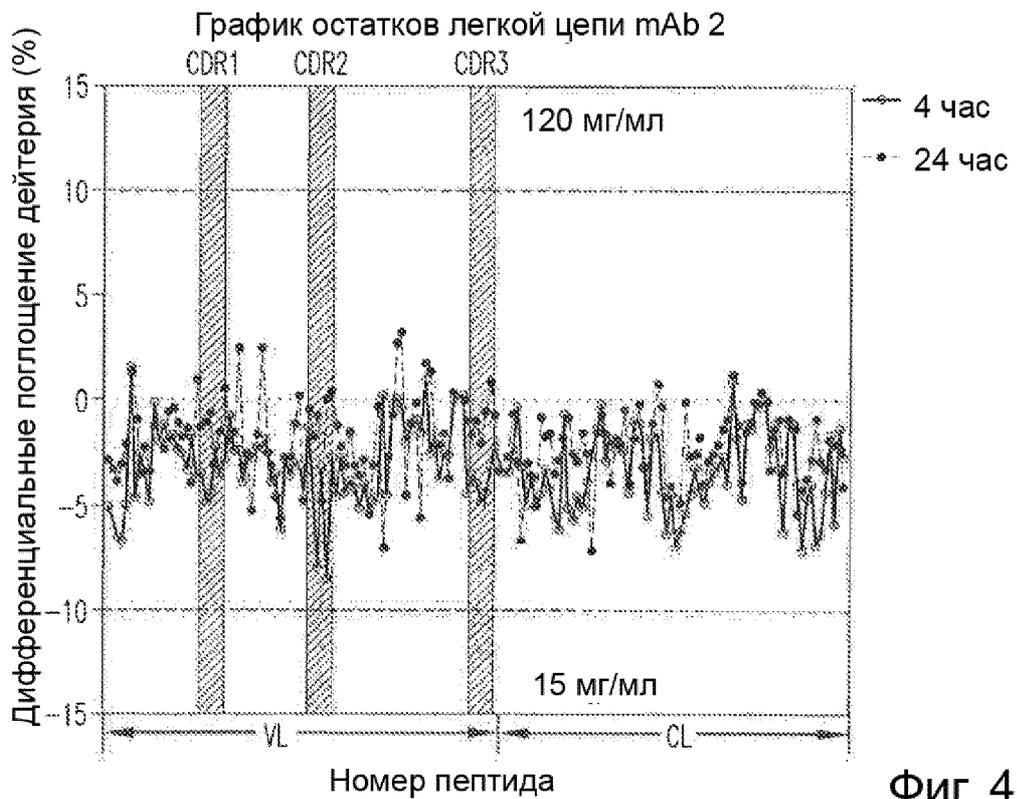


Фиг. 4D





Фиг. 4G



Фиг. 4H